

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590123

研究課題名(和文) 分子生物学・構造生物学を基盤とした植物ネクロシスに関する研究

研究課題名(英文) Molecular- and structural-biological studies on plant necrosis

研究代表者

森元 聡 (MORIMOTO SATOSHI)

九州大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：60191045

研究成果の概要(和文)：

植物ネクロシスの誘導活性を有する低分子化合物として、アサから2種のカンナビノイドの同定に成功した。併せて、植物ネクロシスの誘導に関与することが推定されているシクロフィリンD(CYD)と電位依存性アニオンチャンネル(VDAC)の遺伝子クローニング及びその発現に成功した。VDACについては、VDAC抗体を作製にも成功した。動物のVDAC抗体は、動物ネクロシスを阻害することが報告されているが、上記の抗体は植物ネクロシスを阻害しないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：

Two cannabinoids were identified as plant necrosis-inducing factors from *Cannabis sativa*. In addition, genes encoding cyclophilin D (CYD) and voltage-dependent anion channel (VDAC), which are assumed to be involved in necrosis, were cloned and expressed in *E. coli*. Anti-VDAC antibodies were prepared using recombinant VDAC. Animal VDAC antibodies are known to inhibit necrosis in animal cells, whereas the above VDAC antibodies obtained in my study had such inhibitory effect for plant cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：薬用資源学

1. 研究開始当初の背景

植物の細胞死は、様々な生命現象(落葉、果実の追熟、器官分化、病原菌の感染拡大抑制など)に関わる重要な生体反応の一つとみなされている。植物で誘導される代表的な細胞死として、アポトーシスとネクロシスが知られており、これらはいずれもミトコンド

リア経路で誘導されると推定されている。このうちアポトーシスについては、過酸化水素などが開始因子として同定されており、これらを用いてその誘導経路が詳細に解明されつつある。この結果、動物と類似したメカニズムでアポトーシスが起ることが報告されている。一方植物のネクロシスも動物と

類似したメカニズムで誘導されると推定されているが、ネクロシス開始因子が同定されておらず、この仮説を正確に証明した論文は報告されていなかった。このように植物ネクロシス研究は非常に遅れているのが現状であった。

2. 研究の目的

動物では、mitochondrial permeability transition (MPT、ミトコンドリア膜透過性亢進) pore を構成するタンパク質 [voltage-dependent anion channel (VDAC) など] に cyclophilin D (CYD) が結合することによって pore が開口し、ネクロシスが起ることが報告されている。免疫抑制剤の cyclosporin A (CsA) は CYD に結合することによって、CYD と MPT pore との結合を阻害し (すなわち pore 開口の阻害)、ネクロシスを抑制することが知られている (図 2)。

申請者はアサの幻覚活性本体である THCA がネクロシス型の細胞死を誘導することを発見した。併せて THCA 依存性の植物ネクロシスも CsA によって抑制されるので、植物 MPT pore の開口メカニズムは動物と類似しており、THCA が pore と CYD の結合を触媒すると考えられる。しかしながらその MPT 開口メカニズムは不明であった。

申請課題では MPT を誘導する化合物をさらに探索し、CYD や VDAC の性質や構造的な特徴を分子・原子レベルですることにより植物ネクロシスのメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) カンナビノイドの増殖阻害実験

各種濃度の CBDA 存在下で、アサ培養細胞 (0.1g/10ml) を B5 液体培地中で、25±1°C で 7 日間培養した後、増殖率を算出した。

(2) 各種阻害剤存在下での細胞死誘導

10ml の B5 培地に 0.1g の *Cannabis sativa* 培養細胞を加え、各種阻害剤を下記濃度で添加し、3 時間、25±1°C で培養した。この際、アスコルビン酸、Y-VAD、オーリントリカルボン酸は pH が変化するため、pH を 5.5 に調整した。その後 25±1°C、照明下で 3~6 時間培養し、培養後、CBDA を最終濃度 50µM になるよう加え、25±1°C、24 時間培養した。その後、5-1. 同様に TUNEL 法を行った。この際、コントロールには同量の SDW および DMSO を添加した。

(3) TMRM による膜電位の測定

シクロスポリン前処置を行うサンプルに最終濃度が 100 µM になるようミトコンドリアに添加した。この時、Control、CBDA のみのサンプルには同量の DMSO を加えた。その後、1 時間水中で静置し、TMRM を最終濃度が 2.5 µM となるように添加し、10 分間

水中で静置した。続いて CBDA 溶液を最終濃度が 200 µM となるように添加した。その後、TMRM に基づく蛍光を Ex : 530 nm, Em : 570 nm で測定した。

(1) VDAC 遺伝子のクローニング

タバコ培養細胞より mRNA を抽出し、cDNA を作製した。さらに VDAC 遺伝子増幅用プライマーを用いて、クローニングを試みた。なお、プライマーとして ATGGGCAAGGG ACCTGGACT 及び TGGCTTGAGAGCCAAG GCCA を用いた。

(2) VDAC 遺伝子の発現系の構築

発現ベクターの pET28a(+) を SalI 及び XhoI で処理した後、上記の VDAC 遺伝子を組み込んだ。次いでこのベクターを用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。形質転換した大腸菌に IPTG を添加することにより、組換え VDAC の誘導を行った。IPTG 添加後 5 時間培養した後、大腸菌から VDAC の抽出を行った。

(3) 組換え VDAC の精製

抽出した組換え VDAC を His Bind Resin カラムクロマトグラフィーに付した。カラムを 20mM イミダゾールで洗浄した後、250mM イミダゾールで VDAC を溶出した。VDAC の純度は電気泳動及びウェスタンブロットで確認した。

(4) VDAC 抗体の作成

発現したタンパクを、2 週間間隔で各 0.3 mg、計 5 回ウサギ投与した。5 度目の免疫反応を行って 7 日後、ウサギの全採血により抗血清を得た。途中、血中抗体化確認のため、直接的 ELISA にて測定を行った。すなわち VDAC をイムノプレートに固相化し、1% gelatin PBS でブロッキング、その後希釈した血清を加えてプレート内で抗原抗体反応を行い、次いで二次抗体を用いて酵素標識を行った。最後に、基質溶液を加え発色させた後、405 nm の吸光度を測定した。その結果、免疫原に対する抗体産生が確認された。

(5) CYD のクローニングおよび発現

シロイヌナズナより mRNA を抽出し、cDNA を作製した。さらに VDAC 遺伝子増幅用プライマーを用いて、クローニングを試みた。なお、発現に関しては VDAC と同様の方法で行った。すなわちクローニングした遺伝子を pET28 に組み込み、大腸菌 BL21(DE3) にて発現をおこなった。

3. 研究成果

(1) 新規ネクロシス誘導因子の同定

THCA はアサの培養細胞に対して、強い増殖阻害効果を示すことから、同様の条件を用いて CBDA の増殖阻害活性を測定した。なお、活性を比較するために、THCA、CBCA 及び植物の一般的な細胞死誘導物質で過酸化水素の阻害効果も併せて調べた。

結果は図1に示す通りで、過酸化水素が 5 mM でも増殖阻害を示さないのに対し、3種のカンナビノイドはいずれも 50 μ M という極めて低濃度で完全にアサ培養細胞の増殖を阻害した。このことから、CBDA は THCA や CBCA と同様に極めて強い増殖阻害活性を有することが明らかとなった。

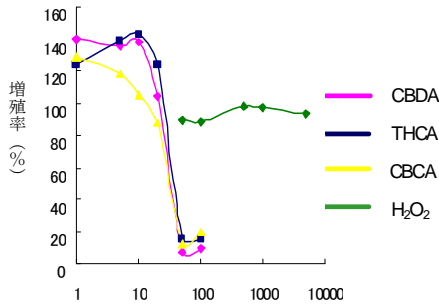


図1 カンナビノイド及びの増殖阻害活性

CBDA がアサの培養細胞に対して増殖阻害効果を示すことを明らかにしたので、その阻害メカニズムを調べた。まず、各種濃度の CBDA 存在下、アサ培養細胞を 24 時間インキュベーションした後、fluorescein diacetate(FDA) を用いて培養細胞の viability を測定した。なお、FDA は生細胞に対して特徴的な緑色の蛍光を呈する試薬である。5 μ M 以上の CBDA 処理した細胞で viability の低下が観察され、50 μ M 以上で完全に培養細胞の蛍光が消失した。

このように、CBDA 処理した細胞で明確な viability の低下が観察されたので、細胞死が誘導されたことが推察された。そこで、TUNEL アッセイを用いて、CBDA 処理したアサ培養細胞中の死細胞の検出を試みた。この結果、FDA アッセイと高い相関性が観察され、50 μ M 以上の CBDA で処理した多くの細胞に、TUNEL 陽性核が観察された(図2)。以上のことから、CBDA はアサの培養細胞に、細胞死を誘導することによって、増殖阻害を引き起こしていることが判明した。

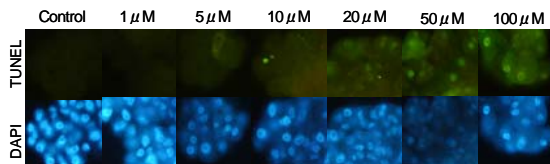


図2 TUNEL アッセイによる DNA の断片化検出

各種細胞死阻害剤を用いて CBDA 誘導性の細胞死のタイプを明らかにする検討を行った。植物のアポトーシスは、多くのケースで過酸化水素の蓄積によって引き起こされ、さらに、caspase の活性化が必須であることが

証明されている。そこで、これらの因子が CBDA 誘導性の細胞死に関与しているかどうか明らかにするために、過酸化水素スカベンジャー (アスコルビン酸) や caspase 阻害剤 (YVAD) の CBDA 誘導性の細胞死に対する効果を調べた。すなわち、両試薬で前処理したアサの培養細胞を、CBDA 存在下で培養した後、DNA 断片化を TUNEL アッセイで観察した。この結果、両試薬による DNA の断片化はまったく阻害されないことから、CBDA 処理した細胞には、アポトーシスは誘導されていないものと考えられた (図3)。

一方植物ネクロシスは MPTpore の開口によって引き起こされることが報告されており、免疫抑制剤の cyclosporin A この開口を阻害することが証明されている。そこで、cyclosporin A の効果を調べた結果、本阻害剤は明確に CBDA による DNA の断片化を阻害した。従って CBDA は MPT 依存的なネクロシスを誘導するものと推察された (図3)。

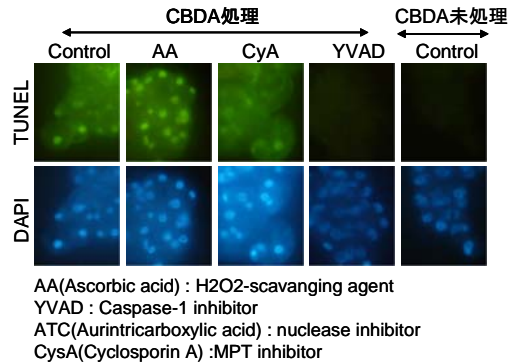


図3 各種阻害剤による細胞死の阻害実験

MPTpore の開口による swelling は、外膜の破壊とともに、膜電位の消失を引き起こすこと知られている。ミトコンドリアの内膜は負に帯電しており、この膜電位を利用して ATP の生産が行われる。従って、膜電位の消失は、細胞の生命維持を不可能にし、速やかに細胞死を起こすことが報告されている。

そこで、CBDA がミトコンドリアの膜電位に与える影響を精査した。本実験では、膜電位の特異的な蛍光指示薬である TMRM による染色法を用いた。アサから単離したミトコンドリアを TMRM で染色した後、CBDA を投与し、蛍光強度を測定した(図4)。この結果、CBDA 処理により TMRM 蛍光が著しく減少することが確認され、膜電位の低下が起こっていることが判明した。膜電位の低下は mPT 依存によるものと呼吸鎖阻害による経路が知られているが、mPTpore の阻害剤である CysA によって CBDA の膜電位低下が阻害されることから、本カンナビノイドは mPT を經由して膜電位を消失させるものと考えられた。

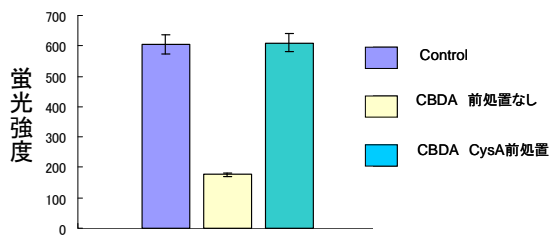


図4 ミトコンドリア膜電位の測定

カンナビノイドが他植物のミトコンドリアにも類似した作用を示すかどうかを確認するために、モデル植物として汎用されているタバコ (BY2 ; Bright Yellow 2) 培養細胞を用いて、前節と同様の検討を行った。すなわち、タバコ培養細胞から単離したミトコンドリアを TMRM で染色した後、各物質を投与し、蛍光強度を測定した(図5)。

この結果、CBGA、THCA、CBDA などの酸性カンナビノイドは、タバコのミトコンドリア膜電位を低下させたが、OLA や geraniol はそのような低下作用が極めて弱いことが明らかとなった(図5)。以上より、アサのみならずタバコにおいても mPTpore の開口因子として機能するためには、酸性カンナビノイド骨格を有することが極めて重要であると考えられた。また、これらの結果はタバコはカンナビノイドを生産してないにもかかわらず、カンナビノイド応答性の MPT 誘導機構を持つことを示唆している。また、CBGA や CBDA が細胞死誘導活性を発見したのは本研究が最初である。

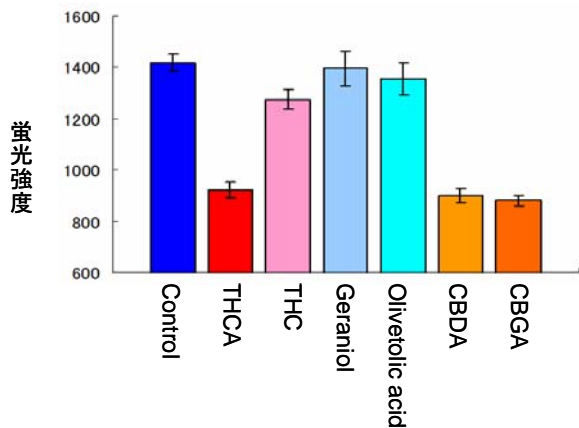


図5 各種化合物の膜電位低下活性

(2) VDAC 遺伝子のクローニングと大量発現

MPT 依存性のネクロシスには VDAC と CYD が関与していることが推察されているが、植物ではこれらの仮説に対する実験的な証明はなされてない。そこでこの仮説を証明するためにタバコ培養細胞から VDAC 遺伝子のクローニングを検討した。目的を達成するために PCR 法を用いた。すなわち、プライ

マーを作製した後、PCR を行った結果、図6に示すように、1種の遺伝子の増幅に成功した。

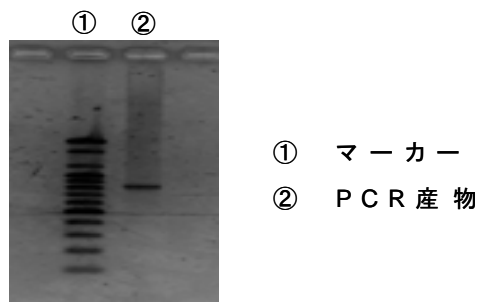


図6 VDAC 遺伝子の増幅

増幅した PCR 産物の塩基配列及び推定アミノ酸配列を図7及び8に示す。

```

ATGGGCAAGGGACCTGGACTTTACTCCGATATCGG
CAAGAGGGCCCGAGATCTTCTGTACAGGGACTACC
AGACTGACCACAAATTCACAATTACTACTACTCT
CCTACTGGAGTTGCTATTACATCATCAGGACTGAA
GAAAGGTGATCTATTTCTGGCTGATGTTAACACTC
AATTGAAGAACAAGAATGTTACAACAGATATAAAA
GTAGACACAAACTCAAATCTTTGGCAACTGTTAC
GGTTGATGAAGCTGCTCCTGGGTTGAAGACAATTC
TTAGCTTCAGAATTCCTGATCAGAGTTCTGCAAAG
CTGGAAGTTCATATTTGCATGACTATGCTGGGAT
TAGCACCAGTCTTGGGTTGACAGCTAACCCCAITG
TCAACTTCTCTGGTGTGGGAACTAATCTTCTC
TCTCTGGGAAGTATCTATCCTTTGACACCAAGGT
GGGAGCTATCACCAAGTGAATGCAGGCTTGAGCT
TCACAAATACCGACCTCATTTGCTTCTTGAATCTG
AATGACAAGGGAGACGCGTTGAGTGCATCGTACTA
CCACATAGTCAGTCCCCTGACTATGACTGCTGTTA
GTGCTGAGGTGACACACAGCTTCTGTACCAATGAG
AACCCATCTCTGTTGGAAGTCAAGCATCAGTTGGA
TCCTTTGACCACCTGTGAAGCAAGAGTTAACACC
TTGGCAAGGCAAAATGCTCTGATCCAACATGAGTGG
CGTCCAAAGTCACTCTTCCACCATCTCAGGAGAAGT
GGACACCAAAGCTGTTGACAAAAGTGCCAAATTTG
GACTGGCCTTGGCTCTCAAGCCA

```

図7 VDAC 遺伝子の塩基配列

```

M G K G P G Y L O Y S D H I G K R A R D
L L P R D V A Y Q I T S S D H I G K R A R D
S F L A D V N T O N L L S K G N F L T K I K G T D
I A K V D T N S T N L L S K N A T R I V I P D D
A A P P G L K T I L L H F D Y A S G G V V S T
S S A L K L E T V A N G P I L V N S F T N S A
T N N L L S L G T T D L S F D D T D L Y
A I S L N L N D K G L S F T N S A T H
H I L V S P L M T T A V S A E V S H
F C T T N E N T I S V N L F G T I S
P L I Q H E W R R P K S N L F G I A
V D T K A V D K S A K F G L A L
L K P

```

図8 VDAC のアミノ酸配列

クローニングした遺伝子は、その塩基配列やそれを基に推定したアミノ酸配列から、VDAC をコードしていると思われた。そこで、本遺伝子の発現系の構築を試みた。すなわち VDAC 遺伝子は、発現用ベクターである pET28a(+) にサブクローニングし、その後発現用大腸菌である BL21(DE3) に形質転換した。形質転換した大腸菌を IPTG 処理することに

より、組換えタンパク質の発現を検討した。この結果、IPTG 処理後、5 時間で発現量が最も高いことが判明した。この組換えタンパク質は可溶性画分にはほとんど存在せず、不溶性たんぱくとして発現していることが明らかとなった(図9)。

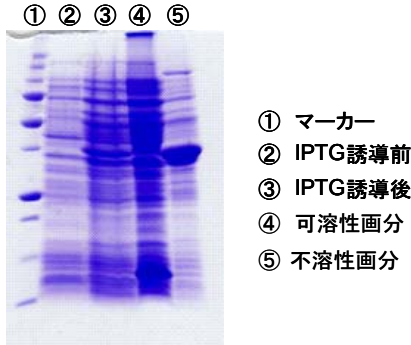


図9 発現タンパクの電気泳動

精製した組換え VDAC をウサギより得られた血清を Protein G カラムクロマトグラフィーに付すことで抗体の精製を行った。Protein G アフィニティーカラムは、大腸菌中で産生させた分子量 22000 のリコンビナント Protein G を CNBr 法によってアガロース担体にカップリングしたもので、このカラムを用いることにより IgG を高純度に精製することができる。10 mM Phosphate buffer (pH 7.0) で安定化した後、100 mM citrate buffer (pH 2.7) を用いて抗体を溶出させた。溶出フラクションは直ちに 1 M Tris-HCl (pH 9.0) で中和し、分取した画分の吸光度 (280 nm) が 1.0 以上のフラクションを回収した。回収後、濃縮し、EtOH に対して 4°C、一晚透析した。透析後のポリクローナル抗体溶液は、使用するまで -20°C で保存した。

動物では抗 VDAC 抗体がネクローシスを阻害することにより、VDAC がネクローシスに関与していることが報告されている。そこで、本研究で調製した VDAC 抗体をタバコミトコンドリアに作用させた後、THCA 処理を行ったが、ネクローシスの誘導は観察されなかった。これらの結果は、VDAC が植物ネクローシスには関与してない可能性を示しているが、詳細に関してはさらに検討を行っている。

(3) CYD 遺伝子のクローニングと発現

シロイヌナズナから mRNA を抽出し、これを鋳型として cDNA を調製した。プライマーを設計し、CYD 遺伝子の増幅を試みた結果、約 700kb の遺伝子の増幅に成功した。図 10、11 に塩基配列と推定アミノ酸構造を示す。

次いで、クローニングした遺伝子を大腸菌で発現を試みた結果、大部分が不溶性タンパク質として発現した。動物の CYD はプロイ

ルイソメラーゼ活性を示すことが知られているので、不溶性組換えタンパク質を可溶性化し、巻もどしを行った後、酵素活性を測定する計画である。

```
ATGGCGAAGATAAAAACCGCAGGCTCTTCTAAATCAA
AGCAAGAAGAAGAAGGGTCCAAGTCGCATAAGTATT
TCCACTAATTATTGTCTGTAACTCTTGTAGTTGCTGTA
GTCATATTATCGTTGGTCACAACCTATCGCCATTGG
TCCCAAAGGTCAAGAAACACAATTGAACATGAAACT
CGGAGTCAGAGATTGAGGACACTAATACTGCGTCA
GGCAAAAAAATACGATCTTCTTGGTTTGTCTGAT
ATAAACACATCAAAGGACTTATAACTGTGCAACTC
TTCAAAGAAGGTTCCCTTGAAGTTGTGGACAAGTTT
CTAGATCTATGTCAAAGATCACTTCAAGGGAAATG
CCGTTTCAGCGGGTTATAAAGAACACTTGTGTACAA
GCTGGTCACTCAACCGAGCTTATACCTGTAGAGAA
TGGAAGCTAAAGGAAAGCTCAGAGGTCGCCCTTAC
ATTGGCCCAAAACATGAGGCATTCATGTTGGGAACA
CCAAAAACAAGGGAACAACAAGGATTTTGTAGCTT
CTGATCACAACGGCCCAATCCCGATCTGAATGAT
CAACTTATAGTGTTTTGAAGAGTCTTAAAGGGAGAG
GATGTAGTACAGGAGATCGAAGAAGTGGATACGGAT
GAGCATTTCCAACCGAAATCGCAATAGGGATCACT
GGTGTGTACTGAAACTAGAGACA
```

図10 CYD 遺伝子の塩基配列

```
MAKIKPQALLNQSKKKKGPSRIS
ISTIIVCNLVVAVVILSLVTTYR
HWSQRSRNTIEHETRSQRFEDTN
TASGQKTYDLPGFADINTSKGLI
TVELFKEGSPPEVVDKFLDLCQKD
HFKGMPFQRVIKNYLVQAGHS PS
SIPVEEWTAKGKLRGRRLHIGPKH
EAFMLGTPKNKGNKDFELLITT
APIPDLNDQLIVFGRVLKGEDVV
QEIEEVDTDEHFQPKSPIGITGV
VLKLET
```

図11 CYD 遺伝子のアミノ酸配列

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

森元 聡、カンナビノイドの生合成に関する化学的・生物学的研究、日本薬学会、2009年3月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森元 聡 (MORIMOTO SATOSHI)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：60191045

(2) 研究分担者

玉田 太郎 (TAMADA TARO)
日本原子力研究開発機構・研究主幹
研究者番号：50391248

田浦 太志 (TAURA FUTOSHI)
九州大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：00301341